

## 白芷의 $\alpha$ -Melanocyte Stimulating Hormone에 의해 유도된 B16 흑색종 세포의 멜라닌 형성에 미치는 영향

홍의석<sup>2)</sup> · 이준혁<sup>1)</sup> · 최병태<sup>1)</sup> · 윤화정<sup>2)</sup> · 고우신<sup>3)</sup>

동의대학교 한의과대학 해부학교실<sup>1)</sup>

동의대학교 한의과대학 안이비인후피부과교실<sup>2)</sup>

동의대학교 한의학임상연구센터<sup>3)</sup>

## Effects of Aqueous Extracts from *Angelica dahurica* Benth. on $\alpha$ -Melanocyte Stimulating Hormone-induced Melanogenesis in B16 Mouse Melanoma Cell.

Ui-suk Hong · Jun-hyuk Lee · Byung-tae Choi · Hwa-jung Yoon · Woo-shin Ko

Melanin determines phenotypic appearance and its electron-opaque property protects cells from physical, including ultraviolet (UV) radiation, and chemical stimuli such as free radicals. However hyper-pigmentation is associated with various skin diseases such as keloid scar. The aim of present study was to investigate the effects of aqueous extracts from *Angelica dahurica* Benth. (AEAD) on  $\alpha$ -Melanocyte stimulating hormone ( $\alpha$ -MSH)-induced melanogenesis in B16 mouse melanoma cell. Relative high doses (5 mg/ml) of AEAD could inhibit melanin formation without apoptotic death in cells treated with  $\alpha$ -MSH. And also,  $\alpha$ -MSH-induced activation of tyrosinase was inhibited in cells treated with AEAD. These results suggest that AEAD inhibit melanogenesis through inhibiting tyrosinase activity, and also, AEAD may apply to develop whitening drugs and cosmetics.

**Key words :** *Angelica dahurica* Benth., Melanogenesis

### 서론

인간의 피부색은 멜라닌(melanin), 혈관분포와 혈 색소, 각질층의 두께 및 카로틴 등 여러 가지에 의

해 좌우되며 이 중 멜라닌이 주된 역할을 한다. 따라서 미백효과를 검정하기 위해서는 멜라닌 형성을 억제하는지 여부를 밝히는 것이 중요하다<sup>1)</sup>.

피부색의 이상을 초래하는 과색소 침착성 질환은 기미, 주근깨, 흑자, 담갈색 색소침착, 염증후 과색 소침착 등으로 구분할 수 있다.<sup>2,3)</sup> 韓醫學에서는 여

교신저자: 고우신, 동의대학교 한의학임상연구센터  
(Tel. 051-850-8657, E-mail: wsko@deu.ac.kr)

러 醫家들에 의하여 形態와 色調에 따라 黚黚<sup>4,6</sup>, 黚點<sup>7</sup>, 面黑<sup>8-11</sup>, 面黚黚<sup>7-12</sup>, 雀卵<sup>6-13</sup>, 斑黚黚<sup>6</sup>, 繫子<sup>6,13</sup>, 雀斑<sup>14-18</sup>, 鰲黑斑<sup>14,15</sup>, 鰲黑黚黚<sup>17</sup>, 黑斑<sup>18</sup> 등 다양하게 表現되어 왔다.

이러한 질환의 원인은 확실하게 밝혀져 있지 않으나, 주로 자외선, 유전적인 요인, 대사, 내분비, 감염 등과 같은 물리적, 화학적 요인들로 인해 멜라닌 합성에 이상이 생긴 것이다<sup>1-3</sup>.

피부의 melanin은 인류학적인 기원과 밀접한 연관성을 가지고 있으며, 실제로 높은 자외선 (UV, ultra violet)의 영향을 받는 저위도 지역은 높은 melanin 함유량을 보이고 있다<sup>19</sup>. 높은 melanin 함유량은 그 자체의 optical and chemical filtering을 통해 자외선에 의해 유발되는 피부손상을 방지한다<sup>20</sup>. Melanin은 melanocyte의 melanosome에서 국한되어 합성되는 생중합체 (biopolymer)이며, 인체 내에서는 강한 햇빛 (주로 자외선)에 대하여 세포의 손상을 막아주는 기능 (photoprotection)뿐 만아니라, 피부색의 결정 (determination of phenotypic appearance), 독성 약물의 흡수 (absorption of toxic drugs and chemicals) 등 여러 중요한 작용을 수행하는 것으로 알려져 있다<sup>21</sup>.

Mouse의 melanoma인 B16 세포는  $\alpha$  melanocyte stimulating hormone ( $\alpha$ -MSH)에 의해 melanogenesis가 시작되며,  $\alpha$ -MSH는 melanocyte의 세포막에 존재하는 melanocortin 1 receptor (Mc1-R)을 통해 adenylate cyclase를 활성화시켜 세포내 cyclic adenosine monophosphate (cAMP)의 양을 증가시키고, 순차적으로 protein kinase A (PKA)를 활성화시켜 tyrosinase의 발현을 유도하거나 발현된 tyrosinase의 활성을 유도하는 것으로 알려져 있다<sup>22,23</sup>.

본 연구에서는 백지 (白芷, *Angelica dahurica Benth.*)의 물추출물이  $\alpha$ -MSH에 의한 B16 mouse melanocyte의 melanogenesis에 어떤 영향이 있는지를 세포내 melanin 생성 및 세포의 melanin 분비, tyrosinase의 활성과 tyrosinase, TRP-1, TRP-2의 protein level을 Western blot을 이용하여 조사하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다

## 재료 및 방법

### 1. 시료의 제조

본 연구에 사용한 *A. dahurica Benth.*는 동의대학교 한의과대학 부속병원에서 공급 받았으며, 100 g의 약재를 증류수 2,000 ml에 넣어 90°C에서 2시간 동안 열수 추출하여, 3,000 rpm에서 30 분간 원심분리하여 침전물을 제거한 다음, 0.45  $\mu$ m의 pore size를 가진 filter로 부유성분을 걸어 낸 다음, 수용 성분을 동결건조 하였다. 동결건조 후 수득물은 *A. dahurica Benth.* 20%를 나타내었으며, 세포에 처리하기 위하여 10% fetal bovine serum (Gibco BRL, NY, USA)과 1%의 penicillin-streptomycin (Gibco BRL)이 함유된 DMEM (Gibco BRL)에 100 mg/ml의 농도를 녹이고, 다시 0.25  $\mu$ m의 pore size를 가진 filter로 여과하여 사용하였으며, *A. dahurica Benth.*의 열수 추출물을 AEAD (aqueous extract from *A. dahurica Benth.*)로 명명하였다.

### 2. B16 melanoma cell의 배양

본 연구에 사용된 mouse melanoma cell인 B16은 원광대학교 한의학전문대학원으로부터 분양 받았으며, 세포의 배양을 위해 90%의 DMEM에 10% fetal bovine serum과 1% penicillin-streptomycin이 포함된 성장배지를 사용하였으며, 5%의 CO<sub>2</sub>가 공급되는 37°C humidity incubator에서 배양하였다. 실험을 위하여 배양 플라스크에 부착되어 있는 B16 세포를 trypsin-EDTA (Gibco BRL)로 부유시켜 1×10<sup>5</sup>개로 100 mm 배양 용기에 나누는 다음, 24시간 동안 안정화시킨 후, AEAD 및 [Nle<sup>4</sup>,D-Phe<sup>7</sup>]  $\alpha$ -MSH (Sigma, CA, USA)를 처리하여 3일 또는 5일 간 배양하였다.

홍의석 외 4인 : 白芷의  $\alpha$ -Melanocyte Stimulating Hormone에 의해 유도된 B16 흑색종 세포의 멜라닌 형성에 미치는 영향

### 3. 세포내 melanin 농도의 측정

B16 세포를 phosphate-buffered saline을 세 번 씻어 내고 1,000 rpm에서 5분간 원심분리하여 상층액을 제거한 후 10%의 DMSO를 함유한 1 N NaOH를 가하여 80 °C에서 1 시간 동안 반응시킨 후, 475 nm에서 흡광도를 측정하였다. Synthetic melanin을 이용하여 농도별 표준곡선을 작성한 후 melanin의 농도를 측정하였다.

### 4. 세포의 melanin의 분비 측정

B16 세포의 배양 상층액을 취하여 404 nm에서 흡광도를 측정하고, 세포의 수를 계수하여 한 개의 세포가 분비한 melanin의 양을 계산하여 대조군을 100%로 놓고 상대적인 값을 측정하였다.

### 5. 세포의 형태적 관찰 및 증식 측정

B16 세포를  $1 \times 10^5$ 개로 100 mm 배양 용기에 나누어 다음, 24시간 동안 안정화시키고 시료를 처리하고, 5일 후 200배율 및 400배율의 위상차 현미경을 이용하여 세포의 형태를 관찰하고 사진을 촬영하였다. 또한 필요에 따라 Hoechst332580 (Molecular probes, CA, USA)을 이용하여 세포의 핵을 염색하여 형광 현미경으로 관찰하여 세포 사멸 여부를 조사하였다. 또한 배양기간 1-5일 까지 매일 세포의 수를 계수하였다.

### 6. 세포내 tyrosinase의 활성 측정

Tyrosinase의 활성은 Martinez-Esparza et al. (1998)의 방법을 수정하여 사용하였다. 간단히 설명하면, B16 세포를 trypsin-EDTA (Gibco BRL)로 부유시켜  $1 \times 10^5$ 개로 100 mm 배양 용기에 나누어 다음, 24시간 동안 안정화시킨 후, AEAD 및  $\alpha$ -MSH를 처리하여 3일간 배양하고, phosphate-buffered saline을 세 번 씻어내고 1,000 rpm에서 5분간 원심분리하여 상층액을

제거하였다. Lysis buffer (1% Triton X-100, 10 mM sodium phosphate, pH 7.0, 0.1 mM PMSF)를 첨가하여 30 분간 얼음에서 반응시켜 세포를 녹인 후, 원심분리하여 상층액을 취하여 tyrosinase 활성 측정용액으로 사용하였다. 단백질 농도  $30 \mu\text{g}$ 의 용액을 취하여 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 7.0)과 0.05% L-DOPA (Sigma)를 첨가하여 37°C에서 반응시키면서 10분 간격으로 405 nm에서 흡광도의 변화를 1시간 동안 관찰하였다.

### 7. SDS-PAGE 및 Western blotting

B16 세포를 PBS로 세 번 수세하고, radioimmunoprecipitation(RIPA) buffer(50 mM Tris-HCl pH7.4, 1% NP-40, 0.25% sodium deoxycholate, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, 1 mM NaF, 1 mM sodium orthovanadate, 1  $\mu\text{g/ml}$  aprotinin, leupeptin, pepstatin)로 lysis를 실시하고, 14,000 rpm에서 20분간 원심분리하여 단백질을 포함하는 상층액을 얻어내어 Bradford's method에 따라 정량한 후 Laemli's sample buffer와 섞어 3분간 끓인 후 8%의 polyacrylamide gel상에서 전기영동을 수행하였다. 전기영동 후, gel상의 단백질을 nitrocellulose membrane으로 옮겨 10% skim milk로 blocking을 한 후, 순차적으로 일차항체 및 이차항체를 처리한 후 enhanced chemiluminescence method로 발광시켜 X-ray 필름에 감광하였다.

## 결 과

### 1. AEAD가 세포내 melanin 생성에 미치는 영향

AEAD를 0.5, 1, 2 mg/ml의 농도로 처리하고, 200 nM의 농도로  $\alpha$ -MSH를 함께 처리한 후 5일간 배양하여 세포내의 melanin의 농도를 측정된 결과, 0.5, 1, 2 mg/ml의 농도에서는 거의 억제효과가 나타나지

않았다 (Fig. 1). 그러나 2차 실험에서 2, 5 mg/ml의 AEAD를 처리한 결과 유의성 있는 결과를 나타내었고, 5 mg/ml에서는 대조군에 비하여 49%의 melanin 생성 억제 작용을 나타내었다(Fig. 2).

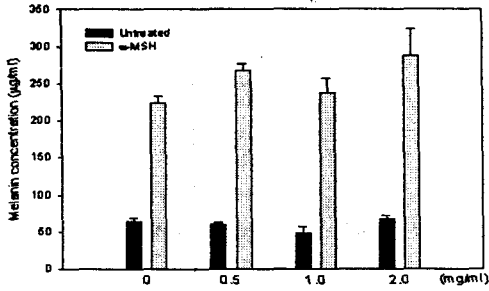


Fig. 1. Effects of AEAD on melanin contents in α-MSH-treated B16 cells. Cells were seeded at  $1 \times 10^5$  cells per dish. After 24 hours, cells were treated with several concentrations of AEAD in presence or absence of 200 nM α-MSH, and cultured for 5 days. Then melanin contents were measured as Materials and Methods. Data are means±S.E. of three experiments performed in duplicate.

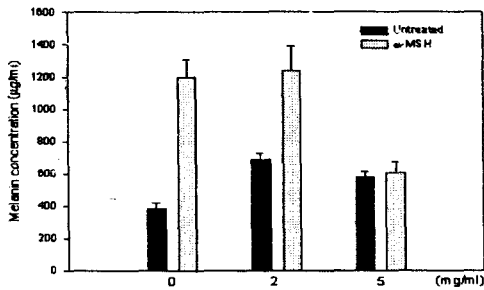


Fig. 2. Effects of AEAD on melanin contents in α-MSH-treated B16 cells. Cells were seeded at  $1 \times 10^5$  cells per dish. After 24 hours, cells were treated with several concentrations of AEAD in presence or absence of 200 nM α-MSH, and cultured for 5 days. Then melanin contents were measured as Materials and Methods. Data are means±S.E. of three experiments performed in duplicate.

## 2. AEAD가 세포의 melanin 분비에 미치는 영향

상대적으로 고농도의 AEAD가 B16 세포의

melanin 생성에 억제효과를 보였으므로 이 세포들이 세포외의 배양액으로 분비하는 melanin의 양을 대조군에 상대적인 값으로 비교하여 보았다. 먼저 앞서 처음으로 세포내 melanin 생성에 사용했던 농도인 0.5, 1, 2, 5 mg/ml를 처리하고 α-MSH를 처리하여 5일간 배양한 후 배양액을 취한다음 그 값을 구하였다. Fig. 3과 4에서 보는 바와 같이 세포의 분비에는 효과가 없는 것으로 관찰되었다.

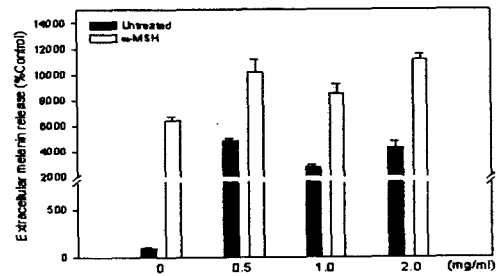


Fig. 3. Effects of AEAD on extracellular melanin accumulation in α-MSH-treated B16 cells. Cells were seeded at  $1 \times 10^5$  cells per dish. After 24 hours, cells were treated with several concentrations of AEAD in presence or absence of 200 nM α-MSH, and cultured for 5 days. Then extracellular melanin contents were measured as Materials and Methods. Data are means±S.E. of three experiments performed in duplicate.

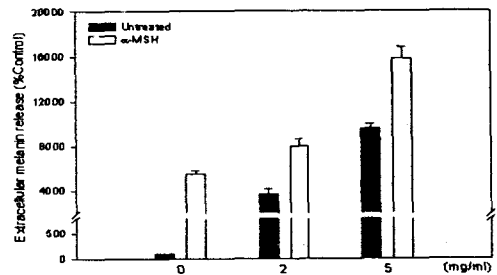


Fig. 4. Effects of AEAD on extracellular melanin accumulation in α-MSH-treated B16 cells. Cells were seeded at  $1 \times 10^5$  cells per dish. After 24 hours, cells were treated with several concentrations of AEAD in presence or absence of 200 nM α-MSH, and cultured for 5 days. Then extracellular melanin contents were measured as Materials and Methods. Data are means±S.E. of three experiments performed in duplicate.

### 3. AEAD가 세포의 형태와 증식에 미치는 영향

AEAD가 B16 세포의 형태에는 어떠한 영향을 미치는지 알아보기 위하여 앞서 처리하였던 농도로 세포에 처리한 후 그 형태를 200배율의 현미경으로 관찰하였다. AEAD는 단독처리군에서 심한 세포 형태의 변화를 유발하였으나, 이 세포의 생존률에는 영향을 나타내지는 않았다 (데이터 미제시). 또한 5 mg/ml의 농도에서  $\alpha$ -MSH에 의한 수지상 돌기의 형성은 AEAD에서 억제되지 않았다. Melanocyte의 melanin의 생성은 melanosome에서 이루어지므로 400배율의 현미경으로 B16 세포의 melanosome 및 melanin deposition을 관찰하고자 하였다. Fig. 6에서 보는 바와 같이  $\alpha$ -MSH의 처리에 의하여 수지상 세포돌기와 함께 세포의 크기가 커짐을 알 수 있었으며, 많은 수의 pigments가 관찰되었다. 그러나 AEAD의 처리에 의하여 그러한 세포내 pigments가 상대적으로 감소함을 알 수 있었다. 한편,  $\alpha$ -MSH에 의한 세포의 크기 증가 및 수지상 돌기의 형성은 앞서 Fig. 5의 결과와 마찬가지로 AEAD가 억제할 수 없었다.

Fig. 5의 결과와 같이 5 mg/ml의 AEAD는 B16세포의 증식을 억제하는 것으로 관찰되었으므로 이에 대한 정확한 데이터를 얻기 위하여 0.5, 1, 2, 5 mg/ml의 AEAD와 200 nM의  $\alpha$ -MSH를 처리하여 5일간 배양하면서 매일 그 수의 변화를 관찰하였다. Fig. 7에서 보는 바와 같이 배양 2일째부터  $\alpha$ -MSH 단독처리 세포와도 성장 격차가 보이기 시작하여 약 78%의 성장 억제를 보였다 (Fig. 7). 이러한 성장 억제에도 불구하고 AEAD의 처리에 의한 세포의 사멸 (cell death)시 나타나는 전형적인 현상인 apoptotic body의 형성 및 chromosome condensation, rounding up 등의 형태적인 변화 (Fig. 8)와 trypan blue 염색에 의한 세포의 생존률 (데이터 미제시)에는 이상이 없었다.

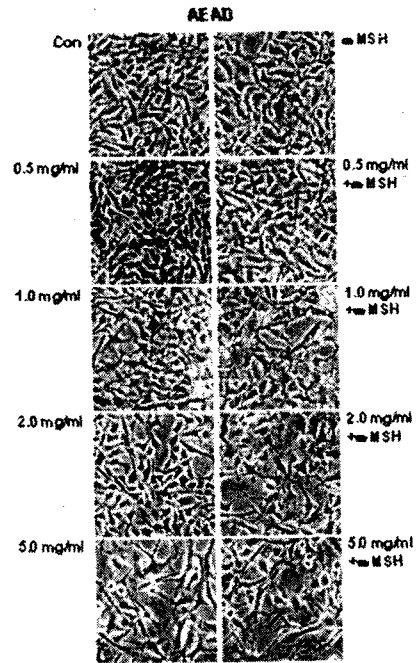


Fig. 5. Effects of AEAD on morphological changes in  $\alpha$ -MSH-treated B16 cells. Cells were seeded at  $1 \times 10^5$  cells per dish. After 24 hours, cells were treated with several concentrations of AEAD in presence or absence of 200 nM  $\alpha$ -MSH, and cultured for 5 days. Then cells were photographed by microscope ( $\times 200$ ).

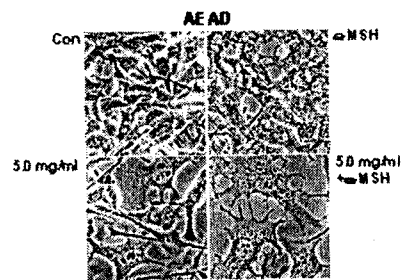


Fig. 6. Effects of AEAD on morphological changes in  $\alpha$ -MSH-treated B16 cells. Cells were seeded at  $1 \times 10^5$  cells per dish. After 24 hours, cells were treated with 5 mg/ml of AEAD in presence or absence of 200 nM  $\alpha$ -MSH, and cultured for 5 days. Then cells were photographed by microscope ( $\times 400$ ).

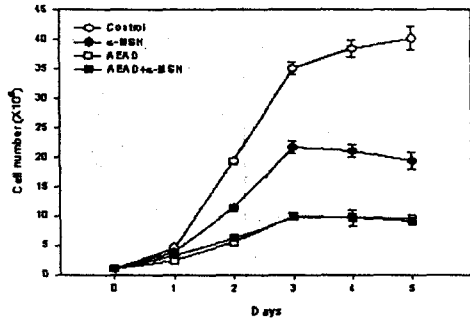


Fig. 7. Effects of AEAD on cell proliferation in  $\alpha$ -MSH-treated B16 cells. Cells were seeded at  $1 \times 10^5$  cells per dish. After 24 hours, cells were treated with  $5 \text{ mg/ml}$  of AEAD in presence or absence of  $200 \text{ nM}$   $\alpha$ -MSH, and cultured for 5 days. Then number of cells were counted by hemocytometer.

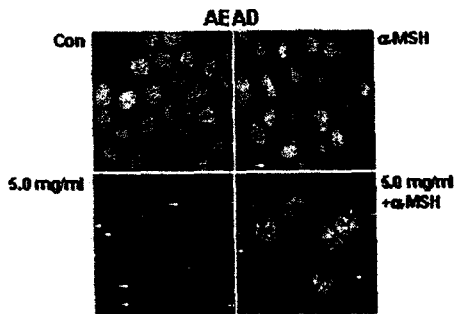


Fig. 8. Effects of AEAD on apoptotic cell death in  $\alpha$ -MSH-treated B16 cells. Cells were seeded at  $1 \times 10^5$  cells per dish. After 24 hours, cells were treated with  $5 \text{ mg/ml}$  of AEAD in presence or absence of  $200 \text{ nM}$   $\alpha$ -MSH, and cultured for 5 days. Then cells were stained by Hoechst332580 and photographed by immunofluorescence microscope ( $\times 400$ ).

#### 4. AEAD가 tyrosinase의 활성에 미치는 영향

$\alpha$ -MSH의 처리에 의한 melanogenesis는 tyrosinase의 발현과 활성화에 의해 일어나는 것으로 알려져 있으므로, 본 연구에서는 AEAD가  $\alpha$ -MSH에 의한 tyrosinase의 활성화에 어떤 영향을 미치는지 조사하였다. B16 세포에  $5 \text{ mg/ml}$ 의 AEAD를  $200 \text{ nM}$ 의  $\alpha$ -MSH와 함께 처리한 후 3일간 배양하고 tyrosinase의 활성을 조사하였다. Fig. 9에서 보는 바와 같이 대조

군에 비해 tyrosinase의 활성도는  $\alpha$ -MSH에 의해 약 34배 정도 증가했으나 AEAD의 처리에 의하여 이러한 활성은 약 53% 정도 억제되는 것으로 나타났다.

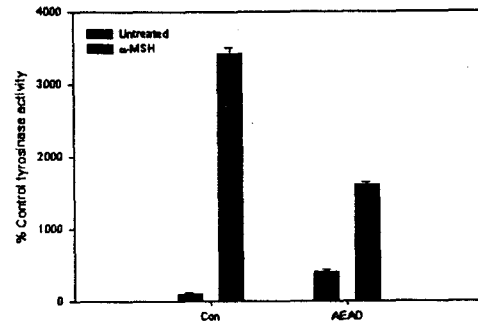


Fig. 9. Effects of AEAD on tyrosinase activity in  $\alpha$ -MSH-treated B16 cells. Cells were seeded at  $1 \times 10^5$  cells per dish. After 24 hours, cells were treated with  $5 \text{ mg/ml}$  of AEAD in presence or absence of  $200 \text{ nM}$   $\alpha$ -MSH, and cultured for 3 days. Then tyrosinase activity was measured as Materials and Methods. Data are means  $\pm$  S.E. of three experiments performed in duplicate.

#### 5. AEAD가 tyrosinase, TRP-1 및 TRP-2의 발현에 미치는 영향

$\alpha$ -MSH에 의한 melanogenesis는 tyrosinase 및 TRP-1과 TRP-2의 단백질 발현에 의해 시작되는 것으로 알려져 있다. 그러므로 본 연구에서는 AEAD가  $\alpha$ -MSH에 의한 tyrosinase와 TRP-1 및 TRP-2의 단백질 발현에 어떤 영향을 미치는지 Western blot으로 조사하였다. Fig. 10에서 보는 바와 같이  $\alpha$ -MSH에 의하여 tyrosinase의 발현은 현저한 증가를 나타내었고 AEAD의 단독 처리에 의하여 tyrosinase 및 TRP-1, TRP-2의 발현이 오히려  $\alpha$ -MSH의 단독처리 세포에 비해 더 증가하는 것으로 나타났다 (Fig. 10).

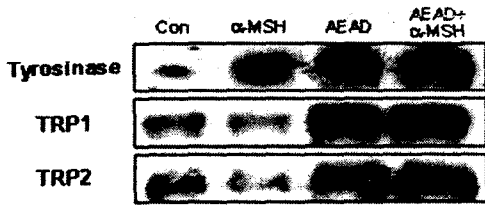


Fig. 10. Effects of AEAD on the protein levels of tyrosinase, TRP-1, and TRP-2 in  $\alpha$ -MSH-treated B16 cells. Cells were seeded at  $1 \times 10^5$  cells per dish. After 24 hours, cells were treated with 5 mg/ml of AEAD in presence or absence of 200 nM  $\alpha$ -MSH, and cultured for 5 days. Then the protein levels were measured as Materials and Methods.

## 고찰

韓醫學에서 皮膚는 臟腑의 生理作用과 밀접한 관계를 가지고 있으며 각각의 臟腑기능은 그 특징이 서로 같지 않아 皮膚에 대한 작용도 같지 않은데, 心은 血脈을 주관하여 心氣의 盛衰가 얼굴색으로 반영되고, 肺는 宣發作用을 주관하기 때문에 외부적으로 皮膚와 결합되어 있고, 脾는 運化作用을 하여 음식물의 소화와 영양분의 수송작용으로 肌肉을 潤澤하고 부드럽게 하며, 肝에는 疏泄作用이 있어 血을 저장하고 조절하는 작용을 하여 皮膚의 혈액순환을 원활하게 하며, 腎은 衛氣와 津液의 化生輸布作用에 관여하여 皮膚의 체온을 유지, 조절하게 하고 부드럽게 한다<sup>24</sup>.

피부의 주요 기능 중 하나는 외부로부터 인체를 보호하는 기능인데, 특히 자외선 노출 시에 멜라닌 세포는 멜라닌을 합성하여 피부의 색소 침착에 중요한 역할을 할 뿐 아니라 생성된 멜라닌이 각질형성세포로 이동하여 과도한 자외선을 흡수하고 차단하는 광 보호작용을 한다고 알려져 있다<sup>25,26</sup>.

인간의 피부색은 여러가지 요인에 의하여 결정되는데, 멜라닌, 혈관분포와 혈색소, 각질층의 두께 및 카로틴 등에 의해 좌우되며, 특히 멜라닌이 주된 역할을 하며, 자외선, 세포의 유전적 요인, 대사, 내분

비, 염증, 감염, 종양 등과 같은 물리적, 화학적 요인들로 인해 멜라닌 합성에 이상이 발생되면 기미, 주근깨, 흑자 등의 과색소 침착증이 발생한다<sup>1-3</sup>.

최근에는 대기오염으로 인한 오존층의 파괴와 이에 따른 자외선의 유해성에 대한 관심이 증가하면서, 이로 인한 피부노화에 따른 피부색의 변화, 침착이 심해지고 있으며, 또한 미용적인 이유에서 피부 착색에 대한 관심이 높아지고 있다<sup>27,28</sup>.

과색소 질환에 대한 확실한 치료법은 아직 정립이 되지 않은 상태이나, 현재 임상가에서 널리 이용되는 방법으로는 미백성 약물, 화학박피술, 레이저 등이 있다. 미백성 약물로는 페놀성 유도체(phenolic derivatives)와 비페놀성 유도체(nonphenolic derivatives)가 있다. 페놀성 유도체는 이미 널리 사용되고 있고 FDA의 승인을 얻은 hydroquinone이 있고 비페놀성 유도체로는 tretinoin과 azelaic acid가 있다. 또한 비타민 C도 멜라닌 생성을 억제하여 기미 치료에 효과가 있다고 알려져 있으나 수용액에서 빨리 산화되어 분해되기 때문에 국소 제제로서의 임상적 사용에는 한계가 제시되어 왔다. 하지만 이온영동법을 이용하여 비타민 C의 흡수를 최대화시키는 방법이 시도되고 있다<sup>1,2,27,29,30</sup>.

한약복합제제에 대한 미백 연구로는 麻黃 및 麻黃膏의 미백효과<sup>31</sup>에 관한 연구와 瀉白散의 미백효과와 검정에 관한 연구<sup>32</sup>, 加減五施玉容散의 미백효과에 관한 연구<sup>33-35</sup> 등이 있으나, 구성 本草 각각의 미백효과보다는 미약하게 나타났다.

Melanin은 L-tyrosine이 다양한 경로의 구조 변화를 일으켜서 만들어지는 최종적인 산물로 eumelanin, pheomelanin, mixed melanin pigment 등으로 구분된다<sup>36</sup>. Eumelanin은 검정색에서 갈색을 (black to brown) 나타내는 색소이며, pheomelanin은 노란색에서 적갈색 (yellow to reddish brown)을 나타내는 색소를 말한다<sup>37</sup>. Melanin의 생합성은 L-phenylalanine이 L-tyrosine으로 hydroxylation되어 시작되거나 L-tyrosine에서 직접적으로 시작되기도 한다<sup>36</sup>. L-tyrosine은 L-dihydroxyphenylalanine

(L-DOPA)로 다시 hydroxylation되며, L-DOPA는 별개의 다른 경로에서 작용하는 melanin과 catecholamine의 precursor가 된다. L-DOPA는 eumelanogenic pathway와 pheomelanogenic pathway의 공통적으로 사용되는 dopaquinone으로 oxidation된다<sup>37)</sup>. Eumelanin과 pheomelanin은 두 가지의 경로 즉, intermediates인 dihydroxyindole (DHI)와 DHI carboxylic acid (DHICA)의 생성과 함께 순차적인 oxidoreduction reactions에 의하여 dopaquinone이 leukodopachrome으로 전환되어 polymerization을 통해 eumelanin으로 형성되는 과정을 eumelanogenesis와 dopaquinone이 cysteine이나 glutathione에 결합하여 cysteinyl-dopa와 glutathionyl-dopa를 형성하고 몇 차례의 전환을 거쳐 pheomelanin으로 합성되는 과정인 pheomelanogenesis를 통하여 생성된다<sup>20)</sup>.

Melanin의 합성은 앞서 언급하였듯이 melanocyte의 melanosome에서 이뤄지며, tyrosinase (monophenol monooxygenase)라는 enzyme에 의해 시작되어지는 연쇄적이며 특이적인 효소반응에 의해 일어난다<sup>38,39)</sup>. 포유동물의 tyrosinase는 여섯 개의 N-glycosylation site를 가진 type I membrane glycoprotein으로 melanosome 내에서만 관찰되며, L-tyrosine을 hydroxylation을 거쳐 L-DOPA로 전환시키며, L-DOPA를 oxidation을 거쳐 dopaquinone으로 전환시키는 과정에 관여한다<sup>39)</sup>. Tyrosinase 이외에도 tyrosinase-related protein 1 (TRP-1)과 tyrosinase-related protein 2 (TRP-2)가 melanogenesis에서 작용하는 것으로 알려져 있으나, 그 기능은 아직 잘 밝혀지지 않고 있다<sup>20)</sup>. 또한 melanocyte의 melanosome에서 생성된 melanin은 인접한 keratinocyte로 운반되어 분해되어 지는 데, 이 과정에는 kinesin, dynein, myosin V 등과 같은 motor protein을 이용한 actin filament와 microtubule이 관여하는 것으로 알려져 있다<sup>41,42)</sup>.

본 연구에서는 AEAD가  $\alpha$ -MSH에 의한 B16 세포의 melanogenesis에 어떤 영향을 미치는지를 조사하였고, 그 결과 상대적으로 높은 고농도인 5 mg/ml의 농도에서 세포내 melanin의 합성을 억제 하였으며,

이것이 melanin 생합성의 주효소인 tyrosinase의 활성 저해에 의한 것임을 알 수 있었다. Fig. 1에서 제시하였던 바와 같이 상대적으로 낮은 농도인 0.5-2 mg/ml에서는 AEAD가 세포내 melanogenesis를 억제할 수 없음을 알 수 있었으나, 상대적으로 높은 농도인 5mg/ml 에서는 유의성있는 억제 정도를 나타내었다 (Fig. 2). 일반적으로 사용되는 한약재의 열수추출물의 농도는 2 mg/ml을 넘지 않는데, 이는 그 약재의 단독 처리에 의한 세포 사멸 또는 괴사와 같은 부작용이 나타나기 때문이다. 그런 이유로 본 연구에서는 Fig 5에서 보여준 바와 같이 AEAD의 농도별 처리가 B16 세포의 형태에 어떤 영향이 있는지를 조사하였다. 그 결과는 앞서도 설명했듯이 배양 접시에서의 세포 밀도 감소와 함께 큰 형태학적 변화를 유발하는 것으로 나타났었다. 그래서 이러한 세포 밀도의 감소가 세포 증식과 어떤 연관성을 가지는지 조사하였고, 또한 Hoechst332580 염색법을 이용하여 AEAD의 처리가 세포의 사멸을 유도하는지도 조사하였다. 그 결과는 Fig. 7과 Fig. 8에서 제시하였던 바와 같이 AEAD가 대조군에 비해 세포 증식의 억제를 유발하지만 그 억제가 세포 사멸과 관련은 없는 것으로 나타났었다. 이러한 결과는 상대적으로 고농도인 한약재 처리에 의해 세포의 생존과 관련된 심각한 부작용이 없음을 의미하므로 본 연구에서는 5 mg/ml의 AEAD를 이용하여 melanogenesis에 미치는 영향을 조사하였다.

AEAD가 세포내 melanin의 합성을 억제하는 것으로 나타났지만 같은 동일한 시간대에 세포 배양액으로 검출한 melanin의 양은 거의 영향을 받지 않거나 오히려 더 높은 양이 검출되었다 (Fig. 3). 현재까지 세포내에서 생성된 melanin이 keratinocyte의 도움 없이 세포 외로 분비된다는 연구결과는 그리 많지 않지만 최근 p38 mitogen-activated protein kinase가 그 과정에 관여한다는 보고는 나와 있는 상황이다<sup>43)</sup>. 흥미롭게도 AEAD의 단독 처리에 의하여 세포의 melanin의 농도가 증가하는 것으로 관찰되었는데, 이는 AEAD가 단독으로 B16 세포의 melanogenesis를



유도하며 melanin의 분비를 유도할 수 있는지에 대한 의문을 남겨 한다. 그러나 Fig. 1과 Fig. 2에서 보였던 결과에 의하면 AEAD는 그 단독으로 melanin의 합성을 유도하지는 못하는 것으로 사료된다. 그러므로 Fig 3과 Fig 4의 결과에 대한 또 한 가지의 추측 가능한 설명은 한약재 시료 자체의 문제가 있을 수 있다는 것이다. AEAD는 100 mg/ml의 농도로 성장배지에 녹여 사용하고 있으며, 이를 세포에 처리할 때에는 0.5-5 mg/ml의 농도로 처리하였는데 그 한약재의 색깔 자체로 인하여 배양액의 melanin을 검출하는데 방해될 수 있다는 것이다. 그러므로 Fig. 3과 Fig. 4에서 제시된 결과는 세포내 melanin의 합성과 세포의 melanin의 분비는 반드시 일치하지 않으며, AEAD는 세포내의 melanin 생합성만을 억제함을 제시한다.

$\alpha$ -MSH에 의한 B16세포의 melanogenesis는 in vivo에서의 melanogenesis와 유사한 양상을 타내는데, 특히 형태적인 관찰에서 볼 수 있는 melanosome 및 수지상 돌기의 형성과 pigments의 deposition이 바로 그것이다(44,45). 수지상의 돌기는 epidermal melanin unit을 이루는 keratinocyte와의 연접을 위하여 melanocyte의 세포막이 확장되는 형태이며, 이 돌기를 통하여 melanosome이 keratinocyte로 이동하게 된다. Melanosome은 melanocyte에서만 볼 수 있는 세포내 구조이며, melanin의 생성 중간 산물들이 아주 큰 반응성을 가지고 있기 때문에 그 독성으로부터 세포를 보호하기 위하여 melanin의 합성은 melanosome 내에서만 일어나는 것으로 알려져 있다(38). Melanosome은 모두 네 단계의 형성기를 가지는데 첫 번째 형성기는 구형의 주머니 형태로 melanosome이 관찰되며 구획화된 여러 구조물들은 전혀 관찰되지 않는다. 두 번째 형성기에는 구형의 melanosome이 타원형으로 바뀌며, 아주 잘 발달된 형태의 구조물들이 관찰된다. 이러한 첫 단계와 둘째 단계의 melanosome을 premelanosome이라 부르며, melanin pigment나 melanogenesis에 필요한 enzymatic activity가 관찰되지 않는다. 세 번째 형성기에는

melanogenesis가 완전하게 활성화되는 시기이며 점진적인 pigment deposition이 시작된다. 마지막 단계인 네 번째 형성기에는 완전한 electron-opaque granule로 melanosome이 가득 차게 되고 melanogenic activity는 감소한다(46). Fig. 6에서 보는 바와 같이  $\alpha$ -MSH의 처리는 B16 세포를 크게 확장시키며, 수지상의 돌기를 형성하게 한다. 또한 세포내의 검은 점의 형태로 melanin이 deposition 되는 것이 관찰되며, 이것을 감싸듯이 하고 있는 구조물이 바로 melanosome이다. AEAD의 처리에 의하여 수지상 돌기의 형성은 억제되지 못하지만 세포내의 melanin deposition은 억제되는 것으로 보이며, AEAD의 melanogenesis에서 melanosome의 첫 번째 또는 두 번째의 형성기를 억제하기 때문일 것으로 사료되는데, 이에 대한 정확한 설명은 전자현미경적인 관찰이 이뤄져야 할 것으로 사료된다. 또한 수지상돌기의 형성을 AEAD가 억제하지 못한 것은  $\alpha$ -MSH에 의한 B16 세포의 분화와 관련이 있으며 여기에는 좀 더 복잡한 기전이 관여할 것으로 사료되며, 이 기전에는 AEAD가 관여하지 않는 것으로 판단된다.

$\alpha$ -MSH에 의한 melanocyte의 melanogenesis는 Mc1-R에  $\alpha$ -MSH가 결합하면서 시작되어 세포내의 여러 신호전달계를 거쳐 microphthalmia-associated transcription factor (MITF)를 활성화시켜 이것의 결합부위를 promoter에 가지고 있는 tyrosinase gene에 결합하게 하여 gene의 transcription을 일으키는 것으로 알려져 있으며, tyrosinase gene promoter에는 이외에도 여러 transcription factors가 결합할 수 있는 부위가 존재하고 다양한 신호전달계에 의해 활성화되는 것으로도 알려져 있다(47). 본 연구에서는 Fig. 9에서 보여준 바와 같이 우선  $\alpha$ -MSH에 의한 tyrosinase의 활성화에 AEAD가 어떤 영향을 미치는지 조사하였고, 그 결과 AEAD가  $\alpha$ -MSH에 의한 tyrosinase의 활성을 50% 이상 감소시키는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 AEAD의 세포내 melanin 합성 억제가 그 과정에 중요한 작용을 하는 tyrosinase의 활성을 떨어뜨림으로써 일어난다는 것을 제시한

다. 이러한 결과가 AEAD가 tyrosinase 자체의 발현을 억제함으로써 나타난 것인지를 알아보기 위하여 Western blot을 실시하였다. 그러나 AEAD의 경우에는 그 발현이 오히려 증가하는 것으로 나타났으며, AEAD 단독 처리세포에서도 tyrosinase의 발현증가가 관찰되었다 (Fig. 10). 세포내 tyrosinase의 발현 조절에는 여러 transcription factors가 관여하고 있으며 또한 다양한 신호전달계의 조절을 받는 것으로 알려져 있다<sup>47)</sup>. 최근의 연구결과에 따르면, 이미 발현된 tyrosinase의 활성은 protein kinase A (PKA) 및 protein kinase C (PKC)의 직접적인 조절을 받는 것으로 알려져 있다<sup>48,49)</sup>. 그러므로 AEAD가 tyrosinase의 발현을 억제하지 못하였지만 활성을 억제할 수 있었던 것은 앞서 언급했던 PKA 또는 PKC의 활성을 직간접적으로 억제함으로써 가능할 것으로 사료된다. 한편 tyrosinase와 함께 melanogenesis에 기능하는 것으로 알려져 있는 TRP-1과 TRP-2는 본 실험에서는 그 발현이  $\alpha$ -MSH의 처리에 의하여 큰 변화를 보이지 않았으나 AEAD를 처리하였을 경우 혼란스런 발현 양상을 나타냈었다 (Fig. 10). 현재까지 TRP-1과 TRP-2의 발현과 그 기능에 관한 연구가 자세히 되어 있지 않다는 점에서 비춰볼 때 앞으로 더 많은 관심이 요구되어진다.

본 연구에서는 AEAD가  $\alpha$ -MSH에 의한 B16 세포의 melanogenesis에 어떤 영향이 있는지를 조사하였다. AEAD는 비교적 고농도에서 세포내 melanin 합성을 억제하였으며, melanin 합성의 주 효소인 tyrosinase의 활성을 감소시키는 것으로 나타났다. 또한 AEAD는 tyrosinase의 발현에는 상관없이 활성만을 감소시키는 것으로 나타났다. 이러한 결과들은 AEAD가 melanini의 합성을 억제함으로써 미백효과를 나타낼 수 있음을 말하며, 이러한 연구결과들은 미백에 효과가 있는 생약 성분의약품 및 화장품 개발에 기여할 수 있을 것으로 사료된다.

## 결론

피부 과색소 질환의 치료에 활용되어진 약물의 하나인 白芷의 멜라닌 형성 억제 효과를 알아보기 위하여 B16 흑색종세포를 이용하여 실험한 결과 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 白芷은 생성을 억제하였다.
2. 白芷는 B16흑색종세포의 최종산물인 멜라닌의 세포외로의 분비에는 효과가 없었다.
3. 白芷는 세포내 pigments의 숫자를 감소시켰다.
4. 白芷는 세포의 크기 증가 및 수치상 돌기의 형성은 억제할 수 없었다.
5. 白芷는 tyrosinase의 활성을 억제하였다.
6. 白芷는 TRP-1, TRP-2의 발현을 증가시켰다.

이상의 결과 白芷은 멜라닌 생성억제 효과를 가지고 있으며, 이러한 과정은 B16 흑색종세포의 tyrosinase 활성을 억제하여 멜라닌 형성을 억제시켰음을 알 수 있었고, 이러한 경로뿐 아니라 더욱 정확한 작용기전에 대한 계속적인 연구가 필요한 것으로 사료된다.

## 참고 문헌

1. 대한피부과학회 : 피부과학, 서울, 여문각, pp.8-9, 402-412, 2001.
2. 안성구 외 : 흔히보는 피부질환, 서울, 고려의학, pp.131-135, 1993.
3. 대한병리학회 : 병리학, 서울, 고문사, pp.1124-1125, 1995.
4. 陳昭遇 外 : 太平聖惠方, 北京, 人民衛生出版社, p.1208, 1986.
5. 李槿 : 偏註醫學入門, 서울, 大星文化社, 雜病篇

- p.29, 224. 1990.
6. 許俊 : 東醫寶鑑 서울, 南山堂, p.211,212, 1981.
  7. 趙佶 : 聖濟總錄, 北京, 人民衛生出版社, p.1763, 1987.
  8. 朱震亨 : 丹溪醫集, 北京, 人民衛生出版社, p.24, 1993.
  9. 樓英 : 醫學綱目, 서울, 大星文化社, p.1081, 1986.
  10. 龔廷賢 : 萬病回春, 서울, 醫聖堂, p.271, 1993.
  11. 王肯堂 : 證治準繩, 北京, 人民衛生出版社, 卷1, p.824, 1991.
  12. 辛民教 外 : 鄉藥集成方, 서울, 永林社, p.1039, 1989.
  13. 周命新 : 醫門寶鑑, 서울, 杏林書院, pp.186-187, 1975.
  14. 陳實功 : 外科正宗, 上海, 上海科學技術出版社, p.290, 298, 1989.
  15. 祁坤 : 外科大成, 臺北, 文光圖書有限公司, p.218, 1968.
  16. 程國彭 : 醫學心悟, 香港, 友聯出版社, p.290, 1961.
  17. 吳謙 : 醫宗金鑑, 北京, 中國醫藥學出版社, pp.1680-1682, 1982.
  18. 顧世澄 : 瘍醫大全, 北京, 人民衛生出版社, p.479, 481-482, 1987.
  19. Post PW, Daniels F Jr, Binford RT Jr. Cold injury and the evolution of "white" skin. *Hum Biol.* Feb;47(1):65-80, 1975
  20. Slominski A, Tobin DJ, Shibahara S, Wortsman J. Melanin pigmentation in mammalian skin and its hormonal regulation. *Physiol Rev.* Oct;84(4):1155-228, 2004
  21. Ito S, The IFPCS presidential lecture: a chemist's view of melanogenesis. *Pigment Cell Res.* Jun;16(3):230-6, 2003
  22. Abdel-Malek Z, Swope VB, Suzuki I, Akcali C, Harriger MD, Boyce ST, Urabe K, Hearing VJ. Mitogenic and melanogenic stimulation of normal human melanocytes by melanotropic peptides. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Feb 28;92(5):1789-93, 1995
  23. Abdel-Malek Z, Suzuki I, Tada A, Im S, Akcali C. The melanocortin-1 receptor and human pigmentation. *Ann N Y Acad Sci.* Oct 20;885:117-33, 1999
  24. 李林 : 實用中醫皮膚病學, 北京, 中醫古籍出版社, pp.1-7, 1998.
  25. Friedmann, P. S, and Gilchrest, B. A. Ultraviolet radiation directly induces pigment production by cultured human melanocyte. *J. Cell Physiol* 133(1):88-94, 1987.
  26. Aberdan, E., Romero, C., and Ortonne, J. P. Repeated UVB irradiations do not have the same potential to promote stimulation of melanogenesis in cultured normal human melanocytes. *J. Cell Sci.* 106:1015-1022, 1993.
  27. Maeda K and Fukuda M : In vitro effectiveness of several whitening cosmetic components in human melanocytes, *J Soc Cosmet Chem*, 42:361-368, 1991.
  28. Mishima Y, Kondoh H and Hatae. S : Overview for development of future innovative skin whitening agents, *Fragrance J*, 24(13), 1996.
  29. Ando, S., Ando, O., Suemoto, Y. and Mishima, Y. Tyrosinase gene transcription and its control by melanogenetic inhibitor. *J. Invest Dermatol.* 100:150-155, 1993.
  30. Masuda, M., Tejima, T. and Suzuki, T. Skin lighteners. *Cosmetics & Toiletries*, 111:65-77, 1996.
  31. 이상희 : 마황 및 마황고의 미백효과에 관한 연구, 경희대학교 동서의학대학원, 2001.
  32. 金成瑛 : 사백산의 미백효과 검증에 관한 연구, 경희대학교 한의과대학, 1991.
  33. 손동석 외 : 가감서시옥용산의 미백효과에 관한 연구, 대한안이비인후피부과학회지15(2):104-117, 2002.

34. 박지선 외 : B16 melanoma 세포주의 멜라닌 합성에 대한 西施玉容散의 효과, 대한동의병리학회지, 14(1):160-170, 2000.
35. 전병훈 외 : 멜라닌 합성의 신호전달기전에 미치는 西施玉容散의 효과, 대한동의병리학회지, 15(1):73-83, 2001.
36. Prota G. The chemistry of melanins and melanogenesis. *Fortschr Chem Org Naturst.* 64:93-148, 1995.
37. Pawelek JM. After dopachrome? *Pigment Cell Res.* 4(2):53-62, 1991.
38. Seiji M, Shimao K, Birbeck MS, Fitzpatrick TB. Subcellular localization of melanin biosynthesis. *Ann N Y Acad Sci.* 15:100:497-533, 1963.
39. Rescigno A, Sollai F, Pisu B, Rinaldi A, Sanjust E. Tyrosinase inhibition: general and applied aspects. *J Enzyme Inhib Med Chem.* 17(4):207-18, 2002.
40. Provance DW Jr, Wei M, Ipe V, Mercer JA. Cultured melanocytes from dilute mutant mice exhibit dendritic morphology and altered melanosome distribution. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 10;93(25):14554-8, 1996.
41. Lambert J, Onderwater J, Vander Haeghen Y, Vancoillie G, Koerten HK, Mommaas AM, Naeyaert JM. Myosin V colocalizes with melanosomes and subcortical actin bundles not associated with stress fibers in human epidermal melanocytes. *J Invest Dermatol.* 111(5):835-40, 1998.
42. Hara M, Yaar M, Byers HR, Goukassian D, Fine RE, Gonsalves J, Gilchrist BA. Kinesin participates in melanosomal movement along melanocyte dendrites. *J Invest Dermatol* 114(3):438-43, 2000.
43. Smalley K, Eisen T. The involvement of p38 mitogen-activated protein kinase in the alpha-melanocyte stimulating hormone (alpha-MSH)-induced melanogenic and anti-proliferative effects in B16 murine melanoma cells. *FEBS Lett.* 7;476(3):198-202, 2000.
44. Seiberg M, Paine C, Sharlow E, Andrade-Gordon P, Costanzo M, Eisinger M, Shapiro SS. The protease-activated receptor 2 regulates pigmentation via keratinocyte-melanocyte interactions. *Exp Cell Res.* 10;254(1):25-32, 2000.
45. Sharlow ER, Paine CS, Babiarz L, Eisinger M, Shapiro S, Seiberg M. The protease-activated receptor-2 upregulates keratinocyte phagocytosis. *J Cell Sci.* 113 (Pt 17):3093-101, 2000.
46. Martinez-Esparza M, Ferrer C, Castells MT, Garcia-Borron JC, Zuasti A. Transforming growth factor beta1 mediates hypopigmentation of B16 mouse melanoma cells by inhibition of melanin formation and melanosome maturation. *Int J Biochem Cell Biol.* 33(10):971-83, 2001.
47. Widlund HR, Fisher DE. Microphthalmia-associated transcription factor: a critical regulator of pigment cell development and survival. *Oncogene.* 19;22(20):3035-41, 2003.
48. Ao Y, Park HY, Olaizola-Horn S, Gilchrist BA. Activation of cAMP-dependent protein kinase is required for optimal alpha-melanocyte-stimulating hormone-induced pigmentation. *Exp Cell Res.* 10;244(1):117-24, 1998.
49. Wu H, Park HY. Protein kinase C-beta-mediated complex formation between tyrosinase and TRP-1. *Biochem Biophys Res Commun.* 28;311(4):948-53, 2003.